

PCT/PT01/00008

REC'D 13 JUN 2001

WIPO

PCT



PORTUGAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

22/11

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

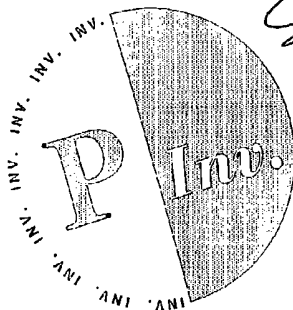
**CERTIFICADO DE PEDIDO
DE PATENTE DE INVENÇÃO**

Certifica-se que os documentos em anexo estão conforme o original do
pedido de patente de invenção nº. 102 469.

O pedido foi apresentado no INPI no dia 17 de Maio de 2000.

Lisboa, 31 de Maio de 2001.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



*Pelo Presidente do Conselho de Administração
do Instituto Nacional da Propriedade Industrial*



**INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

Campo das Cebolas - 1149-035 LISBOA - Portugal
Telef.: +351 21 881 81 00 - Linha Azul: 808 20 06 89
Fax: +351 21 886 00 66 - +351 21 887 53 08
E-mail: inpi@mail.telepac.pt

Campo das Cebolas - 1149-035 LISBOA
Telefs: 21 888 51 51 / 2 / 3
Linha Azul: 21 888 10 78 Fax: 21 887 53 08 / 21 886 00 66
E-mail: inpi@mail.telepac.pt

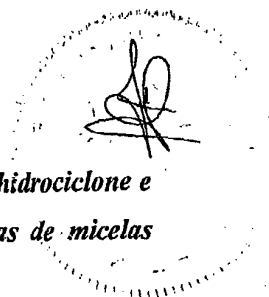


INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

PAT / MOD 4

FOLHA DO RESUMO

<input type="checkbox"/> PAT. INV. <input type="checkbox"/> MOD. UTI. <input type="checkbox"/> MOD. IND. <input type="checkbox"/> DES. IND. <input type="checkbox"/> TOP. SEMIC.			CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL
Nº de Objectos _____ Nº de Desenhos _____			
Nº <u>202469</u> <u>I</u> (11) DATA DO PEDIDO <u>0005/17</u> (22)			
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO, portuguesa, com sede na Av. Rovisco Pais, 1049-001, Lisboa			
CODIGO POSTAL <u>1049-001</u> <u>Lisboa</u>			
INVENTOR (ES) / AUTOR (ES) (72) DUARTE MIGUEL DE FRANÇA TEIXEIRA DOS PRAZERES; ANA ISABEL JORGE DIAS; ANA SOFIA FELICIANO SANTOS; JOAQUIM MANUEL SAMPAIO CABRAL; MARIA LUISA MOURATO SERRALHEIRO			
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE (S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo) COLAR FIGURA
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	Nº DO PEDIDO	
EPIGRAFE (54) " Processo para produção contínua de cristais de dipéptidos num reaktor de hidrociclone e membrana via síntese enzimática e cristalização simultânea em sistemas de micelas invertidas"			
RESUMO (max 150 palavras) (57) O invento refere-se a um processo para a produção de cristais de dipéptidos (fórmula genérica AcXYNH ₂) de elevada pureza (> 95%) por síntese enzimática com uma protease em meio orgânico de micelas invertidas, a partir de derivados dos dois aminoácidos constituintes (AcXOEt e YNH ₂). Foi concebido um reaktor enzimático de membrana e hidrociclone que permite levar a cabo de forma contínua e simultânea a síntese e a cristalização dos dipéptidos. Os cristais do dipéptido assim preparados são removidos continuamente e separados posteriormente do líquido envolvente por filtração ou centrifugação. Os cristais são secos e dissolvidos completamente em metanol quente. Por abaixamento da temperatura o dipéptido re-cristaliza com elevada pureza. No final da re-cristalização o produto é filtrado e seco. A invenção enquadra-se no domínio técnico da Engenharia Bioquímica/Biotecnologia.			

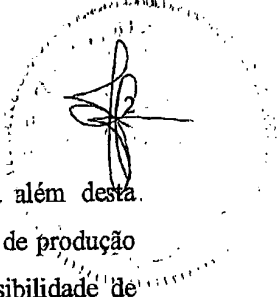


Processo para produção contínua de cristais de dipéptidos num reactor de hidrociclone e membrana via síntese enzimática e cristalização simultânea em sistemas de micelas invertidas

Descrição: O invento refere-se a um processo para a produção de cristais de dipéptidos (fórmula genérica AcXYNH_2) de elevada pureza ($> 95\%$) por síntese enzimática com uma protease em meio orgânico de micelas invertidas, a partir de derivados dos dois aminoácidos constituintes (AcXOEt e YNH_2). Foi concebido um reactor enzimático de membrana e hidrociclone adequado ao sistema de reacção que permite levar a cabo de forma contínua e simultânea a síntese e a cristalização dos dipéptidos. A invenção pertence ao domínio técnico da Engenharia Bioquímica/Biotecnologia.

Nos últimos 20 anos têm sido identificados numerosos péptidos - cadeias curtas de 2 a 50 amino ácidos - biologicamente activos que desempenham funções importantes ao nível do controlo e regulação dos processos biológicos. Estes péptidos podem actuar como neurotransmissores, hormonas, antibióticos e agentes imunológicos e anti-cancerígenos. Existem já alguns medicamentos de natureza peptídica e as perspectivas de que outros possam ser descobertos e desenvolvidos são enormes. Existe hoje em dia, um mercado na área da investigação com apetência crescente para a compra de péptidos biologicamente activos. Embora alguns dos péptidos ocorram naturalmente, a grande maioria é sintetizada quimicamente por ligação dos amino-ácidos (a.a.) constituintes. Duas abordagens de síntese predominam, a síntese "clássica" em solução e a síntese em fase sólida de Merrifield. Uma das maiores desvantagens da síntese química reside na sua baixa selectividade e na necessidade de efectuar operações de purificação (maioritariamente cromatografia de alta pressão - HPLC) extremamente onerosas, que representam uma fracção importante do custo final do produto (+ de 50%).

A tecnologia de produção apresentada é inovadora em diversos aspectos que, no seu conjunto, permitem produzir dipéptidos (cadeias de 2 amino ácidos) com elevada pureza. Em primeiro lugar, o processo recorre à maior selectividade dos catalisadores biológicos,



que à partida originam um número menor de produtos secundários. Para além desta vantagem, e particularmente importante, é também o facto da primeira etapa de produção assentar num conceito inovador de processo integrado, que explora a possibilidade de efectuar simultaneamente, e na mesma unidade, os passos de síntese e purificação. Desta forma, é possível obter uma redução drástica nos custos de purificação, que se reflectirá no custo final do produto. Outra vantagem do processo consiste na simplicidade e baixo custo do equipamento de produção necessário.

O processo refere-se à síntese de dipéptidos a partir de dois derivados de amino-ácidos genéricos X e Y, do tipo AcXOEt (éster etílico do amino ácido X acetilado) e (amida do amino ácido Y) YNH_2 . A designação Ac refere-se ao grupo acetilo e a designação OEt ao grupo éster etílico. A síntese é catalisada por uma protease ou outro enzima com capacidade de sintetizar ligações peptídicas. Podem utilizar-se proteases adequadas como a α -quimotripsina, tripsina ou papaína. A síntese pode também ser efectuada quimicamente, sem recurso a enzimas.

O enzima e o amino ácido de carácter hidrofílico (YNH_2) são dissolvidos num tampão aquoso. Um dado volume desta solução é adicionada a uma mistura de solventes orgânicos (alcano/alcool) contendo um agente tensioactivo. Podem utilizar-se alcanos adequados como o heptano, isooctano ou octano, alcoóis adequados como o hexanol, octanol ou dodecanol e agentes tensioactivos adequados como o brometo de dodecil trimetil amónio, brometo de tetradecil trimetil amónio ou brometo de hexadecil trimetil amónio. Esta mistura é agitada até à solubilização completa da solução aquosa no solvente orgânico, sob a forma de estruturas microscópicas esféricas denominadas micelas invertidas.

O segundo amino-ácido, de carácter hidrofóbico, (AcXOEt) é dissolvido na mesma mistura de solventes orgânicos (alcano/alcool). A reacção de síntese tem início quando se adicionam num reactor (descontínuo ou contínuo) as misturas contendo os dois amino-ácidos. A mesma reacção também ocorre na ausência de enzima, mas muito mais lentamente. Juntamente com o dipéptido formam-se dois produtos secundários (ver figura 1): a) um produto (AcXOH) resulta da hidrólise do amino-ácido AcXOEt , b) o outro produto (AcXOR) resulta da reacção de transesterificação do mesmo amino-ácido com um dos solventes (o álcool ROH).

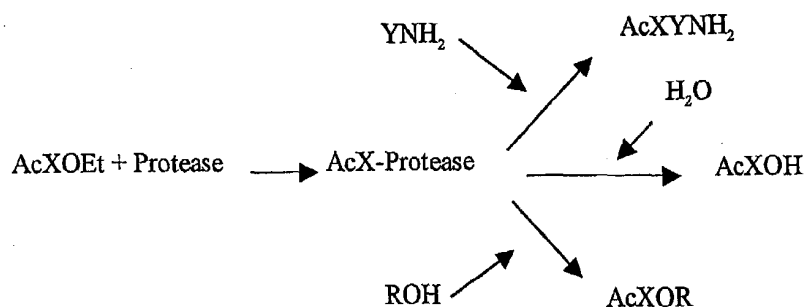
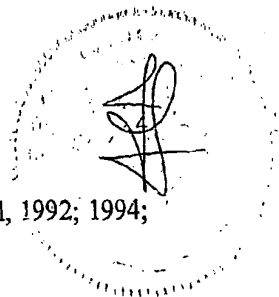


Figura 1 – Reacção de síntese de dipéptidos (AcXYNH_2) catalisada por uma protease a partir dos aminoácidos derivados AcXOEt e YNH_2 , em sistemas de micelas invertidas de tensioactivo/alcano/alcool (ROH). AcXOR : produto secundário de transesterificação, AcXOH : produto secundário de hidrólise.

A composição do meio de micelas invertidas em solventes orgânicos (tipo e concentração do tensioactivo, alceno, álcool, tampão; concentração de água e enzima), é controlada por forma a que: a) as reacções laterais que originam os produtos secundários sejam minimizadas, b) a velocidade e rendimento de síntese do dipéptido AcXYNH_2 sejam máximos, c) a solubilidade dos dipéptidos produzidos seja mínima. Esta composição poderá variar em função do dipéptido específico a ser produzido. Exemplos dos compostos da invenção podem incluir:

N-acetil-L-fenilalanina leucinamida (AcPheLeuNH_2), N-acetil-L-fenilalanina isoleucinamida (AcPheIleNH_2), N-acetil-L-fenilalanina valinamida (AcPheValNH_2), N-acetil-L-fenilalanina alaninamida (AcPheAlaNH_2), N-acetil-L-fenilalanina fenilalaninamida (AcPhePheNH_2), N-acetil-L-fenilalanina metioninamida (AcPheMetNH_2), N-acetil-L-tirosina leucinamida (AcTyrLeuNH_2), N-acetil-L-tirosina isoleucinamida (AcTyrIleNH_2), N-acetil-L-tirosina valinamida (AcTyrValNH_2), N-acetil-L-tirosina metioninamida (AcTyrMetNH_2), N-acetil-L-triptofano leucinamida (AcTrpLeuNH_2), N-acetil-L-triptofano isoleucinamida (AcTrpIleNH_2), N-acetil-L-triptofano valinamida (AcTrpValNH_2).



Este tipo de sistema/reacção foi já descrito na literatura (Serralheiro e Cabral, 1992; 1994; Serralheiro et al., 1994; 1999; Feliciano et al, 1997a; 1997b).

A invenção diz respeito ao processo e ao reactor utilizado para levar a cabo a síntese dos dipéptidos do tipo AcXYNH_2 . A Figura 2 apresenta um desenho esquemático do reactor proposto. O reactor consiste num módulo (D, figura 2) contendo uma membrana tubular de ultrafiltração, acoplado a um vaso de vidro de geometria cilíndrica e fundo cónico denominado hidrociclone (B, figura 2).

A membrana de ultrafiltração (2) é feita de material cerâmico (p.ex. Carbosep^R) ou outro resistente a solventes orgânicos. As soluções contendo cada um dos aminoácidos são adicionadas ao sistema. A temperatura é mantida constante num valor adequado à actividade e estabilidade enzimáticas, e à cristalização. A mistura é retirada do centro do vaso por um tubo central (4) e bombeada (C2) através da membrana cilíndrica (2), retornando ao vaso cilíndrico. Por acção da pressão o líquido atravessa os poros da membrana sendo recolhido no vaso (E). O enzima é retido pela membrana de ultrafiltração, seleccionada por forma a ter um diâmetro de poros inferior ao tamanho do enzima.

A reacção de síntese do dipéptido ocorre no vaso cilíndrico (B) e no módulo de membrana (D). Quando a concentração de dipéptido dissolvido atinge o valor de sobressaturação, inicia-se a formação de cristais. Podem também adicionar-se cristais semente como forma de iniciar a cristalização. Os cristais do dipéptido não atravessam a membrana devido ao seu tamanho. Os produtos secundários AcXOH e AcXOR permanecem em solução, saindo do reactor por permeação através da membrana, e sendo recolhidos num vaso (E). Uma fracção dos reagentes AcXOEt e YNH_2 , também sai do sistema por permeação através da membrana.

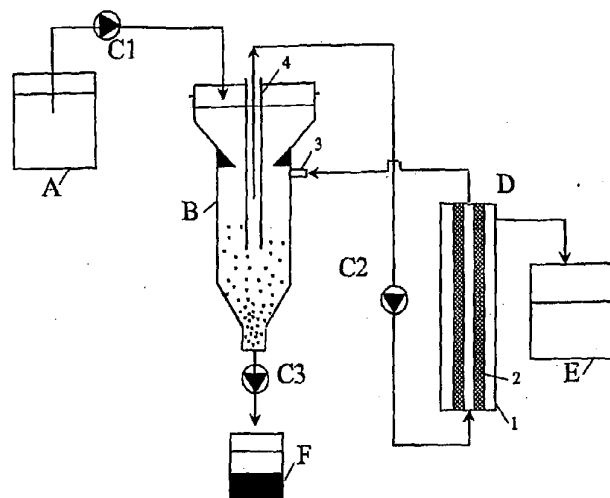
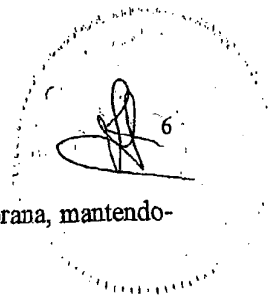


Figura 2: Representação esquemática do reactor enzimático de membrana e hidrociclone para a síntese e cristalização simultânea de cristais de dipéptidos em sistemas de micelas invertidas (A: reservatório de reagentes, B: hidrociclone de vidro ou outro material resistente a solventes, C1, C2 e C3: bombas, D: módulo cilíndrico contendo a membrana cerâmica tubular, E: reservatório com sub-produtos e reagentes não convertidos, F: reservatório de cristais de dipéptidos, 1: módulo cilíndrico de ultrafiltração, 2: membrana cerâmica cilíndrica, 3: entrada lateral colocada tangencialmente, 4: tubo central de saída).

A mistura de reacção entra no hidrociclone por uma entrada lateral (entrada 3 na fig. 2) colocada tangencialmente à parede. Desta forma a mistura adquire um movimento centrífugo que empurra as partículas de cristais para as paredes do vaso. No contacto com as paredes, os cristais perdem velocidade tendendo a sedimentar. Por esta razão, no topo do vaso a mistura encontra-se parcialmente clarificada, enquanto que no fundo se acumulam os cristais que podem ser removidos ao longo do processo, através de uma bomba (C3), sendo recolhidos num vaso (F). As dimensões do hidrociclone são seleccionadas de acordo com conceitos habituais por forma a que o processo de sedimentação seja o mais eficiente possível.

Uma mistura dos dois amino-ácidos em meio de micelas invertidas é adicionada continuamente ao hidrociclone por uma bomba (C1) a partir de um tanque (A). A taxa de

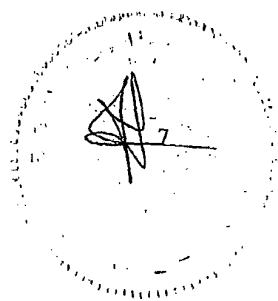


adição deste meio é igual à taxa de permeação de líquido através da membrana, mantendo-se assim constante o volume no reactor.

O processo e o reactor propostos permitem integrar numa só operação os passos de síntese enzimática e purificação de dipéptidos. A composição do meio de micelas invertidas em solventes orgânicos (tipo e concentração do tensioactivo, alcano, álcool), é controlada por forma a que os dipéptidos produzidos nele possuam uma solubilidade muito baixa. Esta composição poderá variar em função do dipéptido específico a ser produzido. A baixa solubilidade possibilita a ocorrência de cristalização em simultâneo com a síntese. A ocorrência de cristalização é vantajosa porque: a) retira o dipéptido da fase líquida, reduzindo assim a sua degradação enzimática por hidrólise secundária, b) purifica grandemente o produto, reduzindo assim o número de operações de purificação posteriores necessárias à obtenção de um grau de pureza adequado.

O reactor concebido explora o princípio de operação dos hidrociclones, permitindo que uma fracção dos cristais sedimente continuamente no fundo cónico. Isto possibilita a sua retirada continua durante o processo de produção, sem prejuízo da reacção de síntese. Não é assim necessário suspender a operação. O desenho do reactor foi elaborado por forma a maximizar a sedimentação no fundo do reactor e a clarificação no seu topo. Por outro lado, a presença de uma membrana de ultrafiltração permite reter o enzima nos sistema e assim operar o processo em contínuo.

Características consideradas inovadoras: O processo desenvolvido possui algumas características consideradas inovadoras, nomeadamente: a) a conjugação de uma reacção de síntese enzimática com a cristalização simultânea do produto formado; b) o acoplamento de um módulo de ultrafiltração com um hidrociclone, que permite a existência de duas correntes de saída do reactor, uma destinada à remoção dos produtos secundários e outra destinada à remoção do produto na sua forma cristalina.

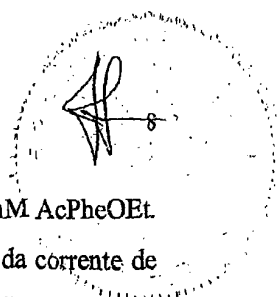


Exemplo 1:

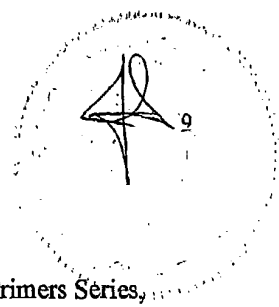
Prepararam-se 9 ml de uma solução de micelas invertidas com a seguinte composição: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo de tetradecil trimetil amónio, 0,55 μ M α -quimotripsina e 10 mM LeuNH₂ (leucinamida). A solução foi colocada num vaso cilíndrico com temperatura controlada a 15 °C e uma agitação de 400 rpm. Iniciou-se a reacção por adição de 1 ml de uma solução de micelas com a seguinte composição: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo de tetradecil trimetil amónio e 30 mM AcPheOEt (éster etílico de acetilfenilalanina). A composição final do sistema foi de: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo de tetradecil trimetil amónio, 0,50 μ M α -quimotripsina, 9 mM LeuNH₂ e 3 mM AcPheOEt. A reacção prosseguiu durante cerca de 1 hora até o consumo completo do aminoácido AcPheOEt. O processo foi monitorizado por HPLC. No final da reacção, os cristais formados foram recolhidos por centrifugação a 4000 rpm. O rendimento da reacção em dipéptido AcPheLeuNH₂, foi de 85 %. Cerca de 89 % deste produto foi recuperado sob a forma de cristais com uma pureza superior a 98 %.

Exemplo 2:

Carregou-se o hidrociclone (B, figura 1) com 270 ml de uma solução de micelas com a seguinte composição: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo de tetradecil trimetil amónio, 0,55 μ M α -quimotripsina e 10 mM IleNH₂ (isoleucinamida). A mistura foi recirculada através do sistema com a bomba C2 a um caudal de 500 ml/min durante 20 minutos. Iniciou-se a reacção por adição de 30 ml de uma solução de micelas com a seguinte composição: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo de tetradecil trimetil amónio e 30 mM AcPheOEt (éster etílico de acetilfenilalanina). A composição final do sistema foi de: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo



de tetradecil trimetil amônio, 0,50 μM α -quimotripsina, 9 mM IleNH₂ e 3 mM AcPheOEt. O sistema foi operado em descontínuo (bomba C1 desligada e recirculação da corrente de permeado de volta ao hidrociclone) a 15 °C durante 1 hora. Iniciou-se então a operação contínua introduzindo a seguinte mistura de reagentes contida no tanque A através da bomba C1: 89,1 % (volume) heptano, 9,9 % (volume) octanol, 1,0 % (volume) tampão carbonato (20 mM, pH 10), 0,1 M de brometo de tetradecil trimetil amônio, 0,50 μM α -quimotripsina, 9 mM IleNH₂ e 3 mM AcPheOEt. O caudal de alimentação foi de aproximadamente 0,25 ml/min, idêntico ao caudal de permeado que passou a ser recolhido no vaso E. Durante todo o período de operação formaram-se cristais do dipéptido AcPheIleNH₂, que se foram acumulando na base do hidrociclone. Periodicamente retiraram-se volumes de 10 ml da mistura contendo os cristais da base do hidrociclone (bomba C3). Os cristais nesta mistura foram separados por centrifugação, retornando o sobrenadante a hidrociclone. Nesta operação produziu-se um total de 3,03 gramas de AcPheIleNH₂. O volume final da mistura foi recolhido e centrifugado tendo-se obtido uma massa de cristais de 3,8 gramas. Após recristalização a partir de metanol quente obtiveram-se cerca de 1,27 gramas de AcPheIleNH₂ com uma pureza > 99 % medida por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).



Referências

- Jones, J. 1992, Amino acid and peptide synthesis. In: Oxford Chemistry Primers Series, N°7, S. G. Davies (ed.), Oxford Science Publishers, Oxford.
- Feliciano, A. S., Cabral, J. M. S. and Prazeres, D. M. F. Quantitative structure activity relationships in the synthesis of AcXYNH₂ dipeptides by α -chymotrypsin in reversed micelles. *Enzyme Microb. Technol.* 1997a, **21**, 284-290
- Serralheiro, M. L. M. and Cabral, J. M. S. Application of fractional factorial design to the study of enzymatic dipeptide synthesis in reverse micelles. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Tramper, J., Vermue, M. H., Beeftink, H. H. and Stockar, U., eds.). Elsevier, Amsterdam, 1992, 725-732
- Serralheiro, M. L. M. and Cabral J. M. S. Synthesis of AcPheLeuNH₂ by α -chymotrypsin in TTAB reversed micelles: application of response surface methodology to the optimization of the system. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **43**, 1031-1042
- Serralheiro, M. L. M., Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S. Dipeptide synthesis and separation in a reversed micellar membrane reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, **16**, 1064-1073
- Serralheiro, M. L. M., Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S. Continuous Production and simultaneous precipitation of a dipeptide in a reversed micellar membrane reactor", *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, **24**, 507-413.
- Feliciano, A. S., Cabral, J. M. S. and Prazeres, D. M. F. Solubility studies and synthesis of AcPheLeuNH₂ in reversed micellar systems. *Biocatal. Biotrans.* 1997b, **14**, 219-234

Lisboa, 08 de Maio de 2000

Diamantino F. G. Durão
(Presidente do IST)

Reivindicações

1ª Processo integrado de síntese e cristalização simultânea para a preparação de cristais de dipéptidos com a fórmula genérica AcXYNH_2 , a partir dos aminoácidos AcXOEt e YNH_2 , caracterizado pela utilização de proteases em meios orgânicos de micelas invertidas.

2ª Processo de acordo com 1, caracterizado pelo facto de ser levado a cabo em reactores descontínuos.

3ª Processo de acordo com 1, caracterizado pelo facto de ser levado a cabo num reactor enzimático de membrana e hidrociclone, que permite a produção contínua ou descontínua dos referidos cristais.

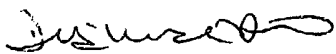
4ª Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo facto de servir para produção de outros dipéptidos e derivados de dipéptidos de fórmula genérica XY , a partir dos aminoácidos X e Y .

5ª Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado pelo facto do processo de síntese não ser enzimático, mas químico.

6ª Processo de acordo com as reivindicações 3, 4 ou 5, caracterizado pelo facto de ao invés de um hidrociclone se acoplar outra unidade ao sistema que permite também a sedimentação e retirada contínua de cristais do sistema.

7ª Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 caracterizado pelo facto dos cristais resultantes serem purificados posteriormente por recristalização num solvente adequado.

Lisboa, 10 de Agosto de 2000


Diamantino F. G. Durão
(Presidente do IST)